Aus der Hautklinik der Universität Düsseldorf

(Direktor: Prof. Dr. Dr. A. Greither)

DIE BEDEUTUNG DES HEPATISCHEN GLUTATHIONS FÜR DIE HEXACHLORBENZOL-INDUZIERTE PORPHYRIE DER RATTE

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

ULRICH P. MEUTER

Düsseldorf 1980

Meuter, Ulrich P.

Die Bedeutung des hepatischen Glutathions für die Hexachlorbenzol-induzierte Porphyrie der Ratte.

198o. 41 S. 8°
Düsseldorf, Univ., Med. Fak., Diss.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543910_0056

Aus der Hautklinik der Universität Düsseldorf

(Direktor: Prof. Dr. Dr. A. Greither)

DIE BEDEUTUNG DES HEPATISCHEN GLUTATHIONS FÜR DIE HEXACHLORBENZOL-INDUZIERTE PORPHYRIE DER RATTE

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

ULRICH P. MEUTER

Düsseldorf 1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Düsseldorf

Dekan: Prof. Dr. H.-L. KRÜSKEMPER

Referent: Prof. Dr. G. GOERZ
Correferent: Prof. Dr. G. STROHMEYER

Druck: aku-Ftodoruck, Gleueler Str. 217,
5000 Köln 41, Tel. 43 72 57

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. EINLEITUNG 1

2. MATERIAL UND METHODEN 5

2.1. Tiere und Behandlung 5

2.2. Bestimmung der Porphyrine und Porphyrin-Vorstufen 6

2.2.1. Gesamt-Porphyrine im Urin 6
2.2.2. Gesamt-Porphyrine in der Leber 7
2.2.3. Porphobilinogen 7
2.2.4. δ-Aminolaevulinsäure 8
2.2.5. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Porphyrine im Urin 8

2.3. Enzymbestimmungen 10

2.3.1. Cytochrom P-450-Gehalt 10
2.3.2. Enzymatische Aktivität des Cytochrom P-450 11

2.4. Glutathion-Gehalt in der Leber 12

2.5. Protein-Bestimmung 12

2.6. Statistik 13

2.7. Material 13

3. ERGEBNISSE 14

3.1.1. Gesamt-Porphyrine im Urin 14
3.1.2. Porphobilinogen und δ-Aminolaevulinsäure . 14
3.1.3. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Porphyrine im Urin 19

3.2. Gesamt-Porphyrine in der Leber 19

Seite

3.3.1. Cytochrom P-450-Gehalt 19
3.3.2. Enzymatische Aktivität des Cytochrom P-450 20
3.4. Glutathion-Gehalt in der Leber 20

4. DISKUSSION 24

5. ZUSAMMENFASSUNG 33

6. LITERATURVERZEICHNIS 35

7. DANKSAGUNG 41

8. LEBENSLAUF 42

ABKÜRZUNGEN

ALA	δ -Aminolaevulinsäure
DEM	Diethylmaleat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
GSH	Glutathion
HCB	Hexachlorbenzol
Pbg	Porphobilinogen
PCT	Porphyria cutanea tarda
RNS	Ribonukleinsäure
(v/v)	Volumen/Volumen
(w/v)	Gewicht/Volumen

1. EINLEITUNG

Hexachlorbenzol (HCB) ist ein weltweit verwendetes Fungizid, und es führt beim Menschen (2, 32) und bei zahlreichen Tierarten (8, 36) zu einer Störung des Haem-Metabolismus (6, 7, 19, 35) sowie zu einer Induktion der mischfunktionellen Monooxygenasen (Cytochrom P-450-System) (11, 20, 33, 34). Das Studium der experimentellen HCB-Porphyrie ist besonders bedeutungsvoll, weil die so induzierte Stoffwechselstörung große Ähnlichkeit mit der Porphyria cutanea tarda (PCT) des Menschen hat. Pathogenetisch wird sowohl für die menschliche PCT, als auch für die tierexperimentelle HCB-Porphyrie u.a. eine Hemmung der Uroporphyrinogen-Decarboxylase angenommen (19).

Im Tierexperiment findet sich unmittelbar nach Beginn der HCB-Fütterung ein Anstieg des Cytochrom P-450-Systems (11, 20, 33, 34), eine Anhäufung von HCB (und HCB-Metaboliten) in der Leber, schließlich eine Akkumulation der Porphyrine in der Leber, und erst danach setzt eine erhöhte Ausscheidung der Porphyrine in Urin und Kot ein (18).

Die Latenzzeit zwischen dem Beginn der HCB-Fütterung und dem Auftreten der Porphyrie, gemessen an der Ausscheidung der Porphyrine im Urin, beträgt etwa 40 bis 60 Tage. Die relativ schnell einsetzende Steigerung

der Porphyrinausscheidung könnte auf dem allmählichen Verlust eines Schutzsystems in den Leberzellen beruhen, das imstande ist, einen Teil der toxischen Wirkungen des HCB zu unterbinden oder abzuschwächen.

Glutathion (GSH) ist eine endogene Verbindung, die die Zellen vor schädigenden Einflüssen durch Fremdstoffe schützt (10) (s. auch Abb. 3, S. 25). Durch seine Nukleophilie ist GSH befähigt, im Stoffwechsel anfallende reaktive Metaboliten (z.B. Epoxide) zu inaktivieren (16). Es handelt sich hierbei in erster Linie um Arzneimittel und Fremdstoffe, die über die Epoxid-Bildung metabolisiert werden und häufig cancerogene und/oder mutagene Eigenschaften aufweisen. Die Metabolisierung dieser Xenobiotika erfolgt in den meisten Fällen durch eine Hydroxylierung mit Hilfe eines Enzym-Komplexes, dem Cytochrom P-450-System (= mischfunktionelles, mikrosomales Monooxygenase-System). Dieses System kommt vorherrschend in der Leber, jedoch auch in geringen Konzentrationen in anderen Organen vor. In Abhängigkeit von der chemischen Struktur dieser aktiven Metaboliten (Epoxide) können sie zu Mercaptursäure-Derivaten umgesetzt werden. Dies geht mit einem Verbrauch an SH-Gruppen, in erster Linie GSH, einher und führt zu einer Senkung des hepatischen GSH-Gehaltes. Die Menge der gebildeten GSH-Konjugate und damit die Eliminierung des Schadstoffs wird durch die Verfügbarkeit des GSH bestimmt. Aus diesem Grund hat der GSH-Gehalt der Leber eine erhebliche Bedeu-

tung für die Metabolisierung dieser Fremdstoffe (besonders halogenierte und heterocyclische Kohlenwasserstoffe) und somit auch für den Gesamtorganismus (10).

Die Rolle des GSH im Haem-Stoffwechsel ist außerordentlich vielseitig:

1. GSH schützt Enzyme, deren katalytische Aktivität von intakten SH-Gruppen abhängt, z.B. die δ-Aminolaevulinsäure-Dehydratase, die Ferrochelatase und das Haem-abbauende Enzym, die Haemoxygenase (13, 14, 23).

2. GSH hat auf zahlreiche Enzyme eine indirekte Wirkung. Die Uroporphyrinogen-Decarboxylase wird durch Schwermetallionen, z.B. Eisen, gehemmt (35). Die Hemmung von SH-Gruppen-abhängigen Enzymen des Haem-Metabolismus durch Schwermetallionen kann aufgehoben werden, wenn diese Ionen durch GSH oder Cystein gebunden werden (24).

3. GSH hat außerdem eine antioxidative Wirkung, und es schützt so die Porphyrinogene, die essentiellen Zwischenprodukte der Porphyrin-Biosynthese, vor der Oxidation zu den inaktiven und biologisch nicht verwertbaren Porphyrinen.

Aus zahlreichen Tierversuchen ist bekannt, daß an der Metabolisierung von Fremdstoffen, insbesondere halogenierter Kohlenwasserstoffe, GSH beteiligt ist.

Das Vorkommen von N-acetyl-S(Pentachlorphenyl)-cystein nach HCB-Gabe weist darauf hin, daß GSH auch bei der Metabolisierung dieses Porphyrogens eine Rolle spielt (31). Neuere Untersuchungen ergaben, daß bei chronischer Applikation von HCB die Manifestation der Porphyrie mit einer signifikanten Senkung des GSH-Gehalts in der Leber einhergeht (12). Da möglicherweise dieser Befund in ursächlichem Zusammenhang mit der Porphyrie-Entstehung unter HCB steht, wurde der Einfluß von GSH-Gaben auf die Entwicklung der HCB-Porphyrie weiblicher Ratten untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluß von Diethylmaleat (DEM) auf die experimentelle HCB-Porphyrie gemessen. DEM senkt bei kontinuierlicher Anwendung den GSH-Gehalt in der Leber (1).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Tiere und Behandlung

Weibliche Wistar-Ratten (Körpergewicht ungefähr 200 g, Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover) wurden über insgesamt 103 Tage unterschiedlichen Behandlungen ausgesetzt. Alle Tiere bekamen eine Standarddiät (Altromin) und hatten freien Zugang zum Trinkwasser.

1. Gruppeneinteilung (40 Tage):

a) 20 unbehandelte Tiere (Standarddiät Altromin)
b) 11 DEM-behandelte Tiere (0.6 %-haltiges DEM-Futter)

2. Gruppeneinteilung (63 Tage):

a) 6 HCB-behandelte Tiere (0.05 %-haltiges HCB-Futter)
b) 6 HCB/GSH-behandelte Tiere (0.05 %-haltiges HCB-Futter), zusätzlich zweimal in der Woche GSH (400 mg/kg Körpergewicht in physiologischer Kochsalzlösung, intraperitoneal)
c) 4 unbehandelte Tiere (Standarddiät, Altromin)
d) 4 GSH-behandelte Tiere (zweimal in der Woche GSH, 400 mg/kg Körpergewicht in physiologischer Kochsalzlösung, intraperitoneal)

e) 7 HCB/DEM-behandelte Tiere (0.05 %-haltiges HCB- und 0.6 %-haltiges DEM-Futter)
f) 4 DEM-behandelte Tiere (0.6 %-haltiges DEM-Futter)

In achttägigem Abstand wurden die Tiere zum Auffangen des Urins in Stoffwechselkäfige gebracht. Im Sammelurin wurden die Ausscheidungen der Porphyrine und Porphyrin-Vorstufen ALA und Pbg) bestimmt. Am 63. Tag der HCB-Exposition wurden alle Tiere getötet und die nachfolgende aufgeführten Parameter bestimmt.

2.2. Bestimmung der Porphyrine und Porphyrin-Vorstufen

2.2.1. Gesamt-Porphyrine im Urin

Die quantitative Porphyrin-Bestimmung erfolgte durch Ionenaustauscherchromatographie. Die Methode wurde, wie bei DOSS und SCHMIDT (5) beschrieben, durchgeführt.

1 ml Urin wurde auf eine Ionenaustauschersäule gegeben, die Säule mit 8 ml Aqua dest. gewaschen und anschließend mit 2 x 2 ml 3N HCl eluiert. Die Extinktion der Lösung wurde bei den Wellenlängen 430 nm und 380 nm und in der Soret-Bande (E_{Max} = 404 nm) gemessen. Anschließend wurden die

Extinktionen korrigiert und mit Hilfe des mittleren Molekulargewichts der Gesamt-Porphyringehalt berechnet.

$$2 \times E_{Max} - (E_{430} + E_{380}) = E_{Corr}$$

$$\text{Gesamt-Porphyrin } (\mu g/ml) = E_{Corr} \times 4.74$$

2.2.2. Gesamt-Porphyrine in der Leber

Die Analyse der Porphyrine in der Leber wurde in einem modifizierten Verfahren in Anlehnung an DOSS und SCHMIDT (5) durchgeführt. Die Lebern wurden in einem Verhältnis von 1 : 50 (w/v) in 0.01 M Acetatpuffer (pH 4.5) homogenisiert, und anschließend wurde 1 ml dieses Homogenats auf eine Anionenaustauschersäule gebracht und wie oben beschrieben weiterverarbeitet.

$$\text{Gesamt-Porphyrine in der Leber } (\mu g/g)$$

$$= 2 \times E_{Max} - (E_{430} + E_{380}) \times 213$$

2.2.3. Porphobilinogen

Die quantitative Bestimmung von Porphobilinogen (Pbg) im Urin wurde nach der Methode von DOSS und SCHMIDT (4) ausgeführt.

Pbg wurde mit Hilfe einer Anionenaustauschersäule aus dem Urin isoliert. Dazu wurden 0.5 ml Urin auf

die Säule gegeben, diese dreimal mit je 10 ml Aqua dest. gewaschen und das Pbg mit 4 ml 1 M Essigsäure eluiert. Nach Zugabe von 4 ml Ehrlich's Reagens wurde nach 15 Minuten bei 553 nm gegen einen Reagenzien-Leerwert (4 ml 1 M Essigsäure) gemessen. Aus den entsprechenden Eichkurven ergab sich folgender Faktor:

$$\text{Pbg } (\mu g/ml) = \frac{1}{E_{553\ nm}} \times 88$$

2.2.4. δ-Aminolaevulinsäure

Die Bestimmung der δ-Aminolaevulinsäure (ALA) im Urin wurde gemäß DOSS und SCHMIDT (4) unter Verwendung einer Doppelionenaustauschersäule durchgeführt. In der oberen Säule (Anionenaustauscher) wurde der störende Harnstoff und das Pbg gebunden. Die ALA der unteren Säule (Kationenaustauscher) wurde mit 7 ml 0.1 M Natriumacetat-Lösung eluiert und 15 Minuten nach Zugabe von Ehrlich's Reagens bei 553 nm gemessen.

$$\text{ALA } (mg/l) = E_{553} \times 60$$

2.2.5. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Porphyrine im Urin

Die verwendete Methode der dünnschichtchromatographischen Auftrennung der Porphyrine wurde bei DOSS (3) ausführlich beschrieben.

Der Urin wird mit Essigsäure auf pH 5.0 eingestellt. Zur Bindung der Porphyrine gibt man Talcum (0.5 g/ 50 ml) hinzu und wäscht anschließend auf einer Glasfritte (G 4) mit Wasser. Nach dem Trocknen bei 100° C über 45 Minuten wird die Veresterung der Porphyrine mit einem Schwefelsäure-Methanol-Gemisch (5/95 (v/v)) durchgeführt, wobei der Ansatz mindestens 12 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln verbleibt. Reste der veresterten Porphyrine werden durch Zugabe von Chloroform aus dem Talcum gewaschen (UV-Kontrolle).

Die Lösung wird mit Wasser gewaschen, mit Natriumbicarbonat neutralisiert und die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet. Das Chloroform wird am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand in wenigen µl Chloroform aufgenommen. Die chromatographische Trennung erfolgt auf Kieselgel-Dünnschichtplatten, die mit einem Chloroform-Methanol-Gemisch (2/1 (v/v)) vorbehandelt und über 60 Minuten bei 100° C regeneriert wurden. Nach dem Auftragen der Porphyrin-Lösung wird die Platte in ein Chloroform-Methanol-Gemisch (130/20 (v/v)) gegeben. Man läßt zur Konzentrierung der Porphyrine bis knapp über den Auftrag laufen. Die eigentliche Trennung der Porphyrine erfolgt in einem Petrolaether-Diethylaether-Gemisch (70/30 (v/v)) und anschliessend in einem Benzol-Essigsäureethylester-Methanol-Gemisch (85/13/1.5 (v/v)). Die Porphyrin-Fraktionen werden dann mit einem Dünnschicht-Auswertegerät in

einer Kurve dargestellt. Die quantitative Auswertung erfolgt mit den entsprechenden Referenzsubstanzen (Uro-, Kopro- und Protoporphyrin-methylester).

2.3. Enzymbestimmungen

2.3.1. Cytochrom P-450-Gehalt

Der Cytochrom P-450-Gehalt im Leberhomogenat wurde durch die Messung des CO-Differenz-Spektrums im reduzierten Zustand des Cytochroms bestimmt (25).

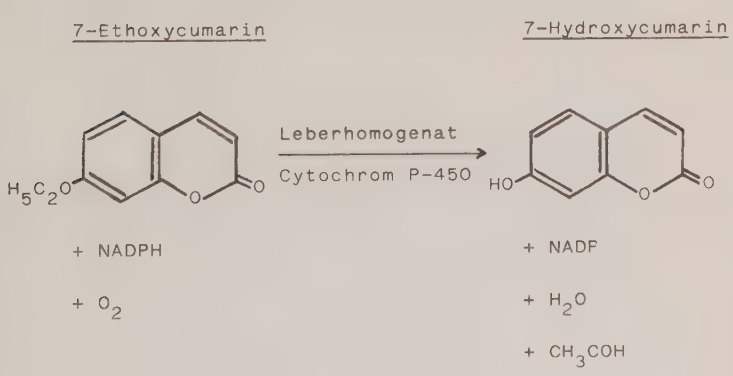
Das Leberhomogenat wurde auf eine Konzentration von 10 - 20 mg Leber/ml Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 150 mM KCl + 10 mM $MgCl_2$) eingestellt und die Suspension 1 Minute mit CO begast. Die Probe wurde gleichmäßig in zwei Kuvetten verteilt und 3 bis 5 Minuten stehen gelassen. Nach Zugabe von Natriumdithithionit (Reduktion des Cytochroms) in die Probenkuvette wurde das Spektrum ermittelt. Die Konzentration des Cytochrom P-450 wurde unter Verwendung des molaren Extinktions-Koeffizienten von 104 nm^{-1} cm^{-1} für die Absorptionsdifferenz zwischen 450 nm und 490 nm berechnet.

2.3.2. Enzymatische Aktivität von Cytochrom P-450

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität des Cytochrom P-450 mit Hilfe des 7-Ethoxycumarins wurde von ULLRICH und WEBER (37) ausführlich untersucht.

Durch die O-Desalkylierung des schwach fluoreszierenden 7-Ethoxycumarins entsteht das stark fluoreszierende 7-Hydroxycumarin (Abb. 1), womit eine empfindliche Methode zur Verfügung steht, die es ermöglicht, die Cytochrom P-450-abhängige Desalkylierung im Leberhomogenat zu messen.

Abb. 1:
Umwandlung von 7-Ethoxycumarin zu 7-Hydroxycumarin unter Einwirkung von Lebermikrosomen, O_2 und NADPH.



2.4. Glutathion-Gehalt in der Leber

Die Bestimmung des Glutathions (GSH) in der Leber erfolgte nach der Methode von PATTERSON und LAZAROW (29). Das Prinzip der Methode besteht darin, daß das Absorptionsmaximum des Reaktionsproduktes (GSH-Alloxan) gemessen wird. Aus der Extinktion wird mit Hilfe einer entsprechenden Eichkurve der GSH-Gehalt bestimmt.

1 ml des Leberhomogenats wurde mit 7 ml Aqua dest. verdünnt, und anschließend wurden 2 ml 25 %ige Metaphosphorsäure hinzugegeben. Nach Zentrifugation wurde 1 ml des Überstandes mit 1 ml Alloxan-Lösung (0.1 M) versetzt. Nach Zugabe von 1 ml 0.5 M Phosphatpuffer (Na_2HPO_4/KH_2PO_4, pH 7.5) und 1 ml 1 N NaOH wurde 6 Minuten inkubiert. Durch die Zugabe von 1 ml 1 N NaOH wird die Reaktion gestoppt und gleichzeitig der Alloxan-GSH-Komplex stabilisiert. Die Probe wird bei 305 nm gegen einen Reagenzien-Leerwert gemessen.

2.5. Protein-Bestimmung

Protein wurde nach der Methode von LOWRY u. Mitarb. (21) unter Verwendung von Rinderserumalbumin als Standard bestimmt.

2.6. Statistik

Die Signifikanz-Berechnungen wurden mit dem Student-t-Test und die Varianz-Analyse wiederholter Messungen gemäß WINER (38) durchgeführt.

2.7. Material

HCB: 98 %, rein (Merck-Schuchardt, München);
Alloxan, DEM, GSH, Kieselgel-Dünnschichtchromatographieplatten 60 F_{254} (Merck, Darmstadt);
Ionenaustauschersäulen (Bio-Rad-Laboratorien, München);
7-Ethoxycumarin (ein Geschenk von Herrn Prof. Dr. V. ULLRICH, Homburg/Saar)

3. ERGEBNISSE

3.1.1. Gesamt-Porphyrine im Urin

Die Porphyrie, gemessen an der Ausscheidung der Porphyrine im Urin, manifestierte sich in den verschiedenen Untersuchungsgruppen nach unterschiedlich langer Latenzzeit (Tab. 1 und Abb. 2). Die Tiere der HCB/DEM-Gruppe wiesen bereits am 35. Tag der HCB-Exposition eine Porphyrie auf (Definition: Gesamt-Porphyrine im Urin > 40 µg/Tier/Tag), während zu diesem Zeitpunkt bei den HCB-Kontrollen lediglich ein leichter Anstieg der Porphyrin-Ausscheidung festzustellen war und bei den mit GSH behandelten Tieren noch normale Werte vorlagen. Bei den HCB-Kontrollen manifestierte sich die Porphyrie am 42. Tag, während sie in der HCB/GSH-Gruppe erst am 49. Tag nachweisbar war.

3.1.2. Porphobilinogen und δ-Aminolaevulinsäure

Die Ausscheidungen der Porphyrin-Vorstufen, Pbg und ALA, zeigten ein ähnliches Verhalten wie die Ausscheidung der Gesamt-Porphyrine (Tab. 2 und 3).

Tab. 1:

Ausscheidung der Gesamtporphyrine (µg/Tier/Tag) im Urin weiblicher Ratten, die über 63 Tage behandelt wurden (Einzelheiten s. Material und Methode). Alle Werte sind als Mittelwert und Standardabweichung ($\bar{x} \pm S$) angegeben; n = Anzahl der untersuchten Tiere.

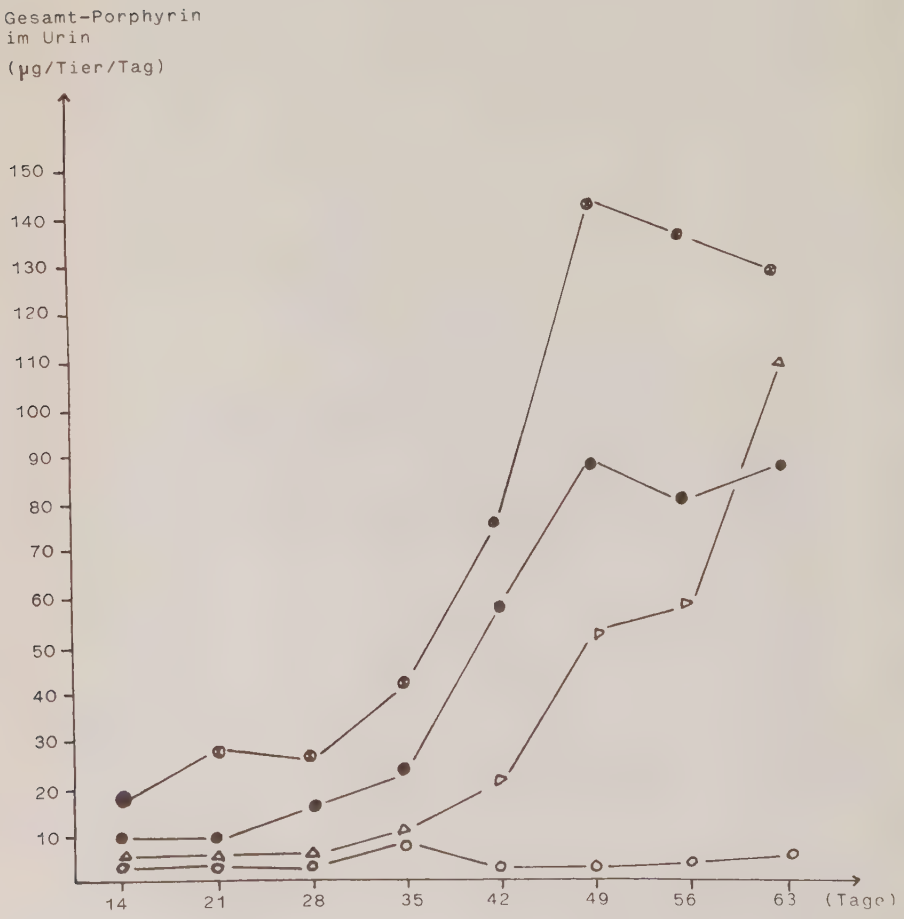
n	Art der Behandlung	Exposition der Tiere (in Tagen)							
		14	21	28	35	42	49	56	63
6	HCB	9 ± 4	9 ± 3	16 ± 7	22 ± 9	58 ± 22*	90 ± 22*	80 ± 27*	87 ± 32*
6	HCB/GSH	7 ± 5	7 ± 3	7 ± 3	8 ± 4	21 ± 18	54 ± 31*	58 ± 54*	117 ± 52*
7	HCB/DEM	16 ± 4	28 ± 13	25 ± 9	41 ± 16*	75 ± 34*	143 ± 76*	136 ± 64*	128 ± 52*
4	Kontrolle	3 ± 3	4 ± 4	3 ± 3	3 ± 4	3 ± 3	3 ± 3	3 ± 3	4 ± 1
4	GSH-Kontr.	4 ± 2	7 ± 3	5 ± 2	6 ± 2	2 ± 1	4 ± 2	5 ± 3	7 ± 2
4	DEM-Kontr.	4 ± 2	6 ± 3	8 ± 2	2 ± 3	3 ± 1	4 ± 2	4 ± 3	7 ± 5

* = Manifestation der Porphyrie (Porphyrin-Ausscheidung im Urin > 40 µg/Tier Tag)

Abb. 2:

Darstellung der Gesamt-Porphyrin-Ausscheidung über 63 Tage. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ($\bar{x}$) der Tab. 1 (Gesamt-Porphyrine µg/Tier/Tag). Die Standardabweichungen wurden der besseren Übersicht wegen nicht eingezeichnet. Da sich GSH- und DEM-Kontrollen nicht von den Werten der unbehandelten Tiere unterschieden, wurden diese weggelassen.

● ——— ● HCB
△ ——— △ HCB/GSH
⊛ ——— ⊛ HCB/DEM
○ ——— ○ unbehandelte Kontrollen



Tab. 2:

Porphobilinogen-Ausscheidung (µg/Tier/Tag) im Urin weiblicher Ratten, die über 63 Tage behandelt wurden (Einzelheiten s. Material und Methoden). Alle Werte sind in Mittelwert und Standardabweichung ($\bar{x} \pm S$) angegeben; n = Anzahl der untersuchten Tiere.

n	Art der Behandlung	Exposition der Tiere (in Tagen)							
		14	21	28	35	42	49	56	63
6	HCB	13±3	16±7	14± 7	24±18	40± 16*	109± 16*	96± 50*	132± 99*
6	HCB/GSH	11±3	15±4	26±21	18± 4	54± 39*	94± 82*	136±131*	205±109*
7	HCB/DEM	19±4	15±2	25± 4	36±21	116±144*	339±322*	192±192*	191± 75*
4	Kontrolle	18±9	20±3	15± 3	13± 2	13± 2	18± 6	20± 3	13± 6
4	GSH-Kontr.	13±2	13±2	16± 4	18± 2	13± 2	13± 4	13± 6	16± 5
4	DEM-Kontr.	16±2	13±2	13± 4	13± 2	16± 5	13± 2	16± 4	16± 4

* = Manifestation der Porphyrie (Pbg-Ausscheidung > 40 µg/Tier/Tag)

Tab. 3:

δ-Aminolaevulinsäure-Ausscheidung (µg/Tier/Tag) im Urin weiblicher Ratten, die über 63 Tage behandelt wurden (Einzelheiten s. Material und Methoden). Alle Werte sind in Mittelwert und Standardabweichung ($\bar{x} \pm S$) angegeben; n = Anzahl der untersuchten Tiere.

n	Art der Behandlung	Exposition der Tiere (in Tagen)							
		14	21	28	35	42	49	56	63
6	HCB	33±14	36± 9	51± 6	49±16	155± 35*	210±78*	162±31*	157±36*
6	HCB/GSH	39±16	52±15	69±12	38± 4	50± 4	166±41*	193±35*	196±49*
7	HCB/DEM	35±14	66± 7	65±15	94±22	249±114*	207±61*	189±35*	172±25*
4	Kontrolle	54±13	42± 8	36± 9	51±13	45± 4	54± 4	29± 6	53± 6
4	GSH-Kontr.	48±16	57±11	42±13	49± 6	53± 4	56± 9	43± 4	45± 5
4	DEM-Kontr.	47±13	51± 4	52± 9	49± 8	44± 7	52±11	52±10	46±14

* = Manifestation der Porphyrie (ALA-Ausscheidung > 100 µg/Tier/Tag)

3.1.3. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Porphyrine im Urin

Die Auftrennung der Gesamt-Porphyrine im Urin am 35., 42. und 63. Tag nach HCB-Exposition ergibt, daß die manifeste Porphyrie bei der HCB- und bei der HCB/GSH-Gruppe durch das Vorherrschen der Uroporphyrine gekennzeichnet ist (Tab. 4 a und 4 b, S. 21 und 22).

3.2. Gesamt-Porphyrine in der Leber

Die Porphyrine in der Leber nach dem 63. Tag der HCB-Exposition waren in allen mit HCB behandelten Gruppen signifikant erhöht, wobei in der HCB/GSH-Gruppe die Porphyrin-Konzentration am niedrigsten lag. Die alleinige Gabe von GSH und DEM führte zu keiner nachweisbaren Änderung der Leber-Gesamt-Porphyrine (Tab. 5, S. 23).

3.3.1. Cytochrom P-450-Gehalt

Der Cytochrom P-450-Gehalt war in allen mit HCB behandelten Gruppen gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht. Allerdings wies die mit HCB/GSH behan-

delte Gruppe im Vergleich zu den übrigen HCB-Kontrollen und der HCB/DEM-Gruppe einen signifikant geringeren Cytochrom P-450-Gehalt der Leber auf (Tab. 5, S. 23).

3.3.2. Enzymatische Aktivität des Cytochrom P-450

Die enzymatische Aktivität des Cytochrom P-450 (gemessen als 7-Ethoxycumarin-Desalkylierung), war in allen mit HCB behandelten Gruppen in gleicher Weise erhöht (Tab. 5, S. 23). Hier findet sich keine Änderung in der HCB/GSH-Gruppe, wie dies beim Cytochrom P-450-Gehalt beobachtet wurde.

3.4. Glutathion-Gehalt der Leber

Der GSH-Gehalt der Leber war nach 63 Tagen HCB-Exposition bei allen mit HCB behandelten Tiere signifikant erniedrigt. Die Zufuhr von GSH konnte keine nennenswerte Steigerung der GSH-Konzentration auslösen. Dies betrifft sowohl die GSH-Kontrollen im Vergleich zu den Normaltieren, als auch die HCB/GSH-Gruppe gegenüber den HCB-Kontrollen. Die DEM-Applikation verstärkt die HCB-bedingte GSH-Senkung nicht. Im Gegensatz dazu führt DEM allein zu einer Senkung des GSH-Gehalts auf etwa die Hälfte im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Tab. 5, S. 23).

Tab. 4 a:

Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Gesamt-Porphyrine im Urin weiblicher Ratten, die über 63 Tage (t) behandelt wurden (Einzelheiten s. Material und Methoden). Alle Werte (relative Prozent (%) des Gesamt-Porphyrins) sind in Mittelwert und Standardabweichung ($\bar{x} \pm S$) berechnet; n = Anzahl der Tiere.

n	t	Art der Behandlung	Uro. (%)	Hepta. (%)	Hexa. (%)	Penta. (%)	Kopro. (%)	Tri. (%)	Proto. (%)
6	35	HCB	36 ± 3	16 ± 3	11 ± 2	5 ± 2	29 ± 5	1 ± 1	3 ± 2
6	35	HCB/GSH	23 ± 2	13 ± 2	9 ± 1	3 ± 2	41 ± 2	4 ± 2	7 ± 2
7	35	HCB/DEM	23 ± 6	8 ± 2	6 ± 1	4 ± 1	59 ± 7	$\pm$	-
6	42	HCB	46 ± 2	13 ± 5	8 ± 1	3 ± 1	28 ± 6	1 ± 1	1 ± 1
6	42	HCB/GSH	48 ± 9	15 ± 2	7 ± 1	2 ± 1	26 ± 5	1 ± 1	1 ± 1
7	42	HCB/DEM	28 ± 7	11 ± 4	7 ± 3	5 ± 2	49 ± 10	-	-
6	63	HCB	47 ± 4	16 ± 4	8 ± 1	4 ± 1	25 ± 7	-	-
6	63	HCB/GSH	45 ± 3	13 ± 4	10 ± 1	2 ± 1	29 ± 5	-	2 ± 2
7	63	HCB/DEM	40 ± 8	10 ± 5	5 ± 1	4 ± 2	40 ± 7	1 ± 1	-
4	63	Kontrolle	25 ± 5	7 ± 1	4 ± 1	4 ± 1	45 ± 2	4 ± 1	12 ± 3
4	63	GSH-Kontr.	18 ± 4	6 ± 3	5 ± 2	3 ± 2	48 ± 7	2 ± 2	18 ± 8
4	63	DEM-Kontr.	22 ± 7	4 ± 3	2 ± 2	3 ± 1	51 ± 6	3 ± 2	15 ± 4

Tab. 4 b:

Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Gesamt-Porphyrine im Urin weiblicher Ratten, die über 63 Tage (t) behandelt wurden (Einzelheiten s. Material und Methoden). Alle Werte (µg/Tier/Tag) sind in Mittelwert und Standardabweichung ($\bar{x} \pm S$) angegeben; n = Anzahl der untersuchten Tiere.

n	t	Art der Behandlung	Uro.	Hepta.	Hexa.	Penta.	Kopro.	Tri.	Proto.
			(in µg/Tier/Tag)						
6	35	HCB	7.9± 0.7	3.5±0.7	2.4±0.4	1.1±0.4	6.4±1.1	0.2±0.2	0.7±0.4
6	35	HCB/GSH	1.8± 0.2	1.0±0.2	0.7±0.1	0.2±0.2	3.3±0.2	0.3±0.2	0.6±0.2
7	35	HCB/DEM	9.4± 0.2	3.3±0.8	2.5±0.4	1.6±0.4	24.2±2.9	-	-
6	42	HCB	26.7± 1.2	7.5±3.0	4.6±0.6	1.7±0.6	16.2±3.5	0.6±0.6	0.6±0.6
6	42	HCB/GSH	10.1± 1.9	3.2±0.4	1.5±0.2	0.4±0.2	5.5±1.1	0.2±0.2	0.2±0.2
7	42	HCB/DEM	21.0± 5.3	8.3±3.0	5.3±2.3	3.8±1.5	36.8±7.5	-	-
6	63	HCB	40.9± 3.5	13.9±3.5	7.0±0.9	3.5±0.9	21.8±6.1	-	-
6	63	HCB/GSH	52.7± 3.5	15.2±4.7	11.7±1.2	2.3±1.2	34.0±5.9	-	2.3±2.3
7	63	HCB/DEM	51.2±10.2	12.8±6.4	6.4±1.3	5.1±1.6	51.2±9.0	1.3±1.3	-
4	63	Kontrolle	1.0± 0.2	0.3±0.04	0.2±0.04	0.2±0.04	1.8±0.1	0.2±0.04	0.5±0.1
4	63	GSH-Kontr.	1.3± 0.3	0.5±0.2	0.4±0.1	0.2±0.1	3.4±0.5	0.1±0.1	0.3±0.6
4	63	DEM-Kontr.	1.5± 0.5	0.3±0.2	0.1±0.1	0.2±0.1	3.6±0.4	0.2±0.1	1.1±0.3

Tab. 5:

Lebergewicht, Gehalt der Leber an Gesamt-Porphyrin, an Glutathion, an Cytochrom P-450 und O-Desalkylierung von 7-Ethoxycumarin bei weiblichen Ratten, die über 63 Tage behandelt wurden (Einzelheiten s. Material und Methoden). Alle Werte sind in Mittelwert und Standardabweichung ($\bar{x} \pm S$) angegeben; n = Anzahl der untersuchten Tiere.

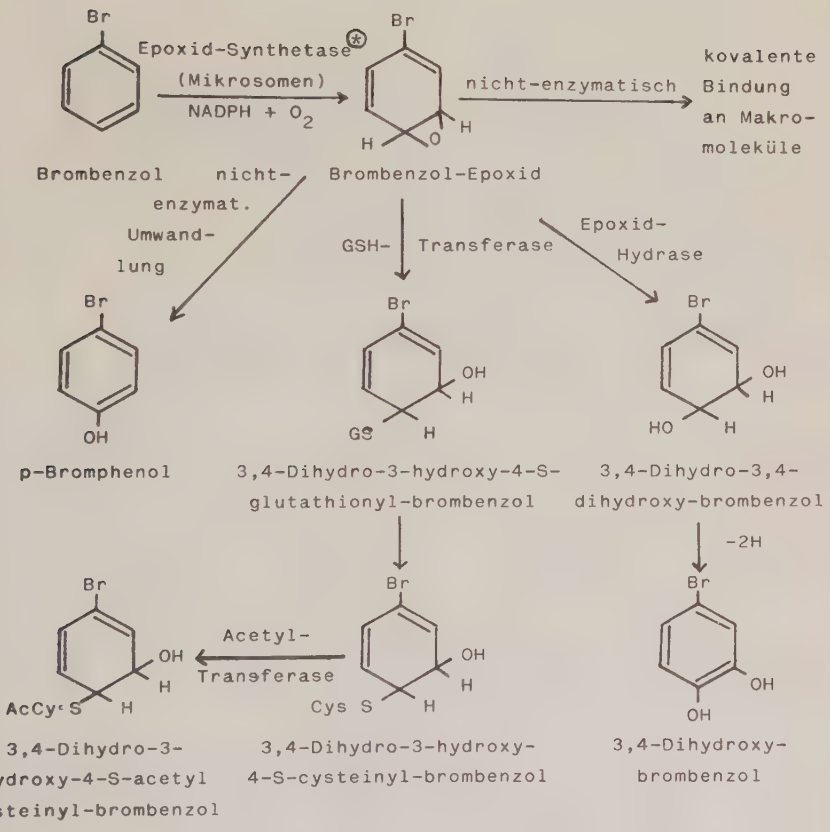
n	Art der Behandlung	Lebergewicht (g)	Gesamt Porphyrin (µg/g Leber)	GSH-Gehalt (mg/g Leber)	Cytochrom P-450 (nMol/g Leber)	7-Ethoxycumarin-O-Desalkylierung (nMol Umbelliferon^{-1} x mg Protein^{-1} x min^{-1})
6	HCB	11.0±0.3*	85±49*	0.77±0.14*	175±51*	1.64±0.16*
6	HCB/GSH	13.4±3.7*	96±50*	0.90±0.12*	75±11*	1.58±0.23*
7	HCB/DEM	10.4±1.2*	60±27*	0.76±0.14*	164±46*	1.68±0.17*
4	Kontrolle	6.5±0.3	0.30±0.02	1.80±0.20	38± 6	0.11±0.03
4	GSH-Kontr.	7.4±0.4	0.34±0.06	2.10±0.30	36± 5	0.09±0.03
4	DEM-Kontr.	5.9±0.3	0.32±0.05	1.16±0.05*	34± 5	0.12±0.02

* = $p < 0.05$ im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren

4. DISKUSSION

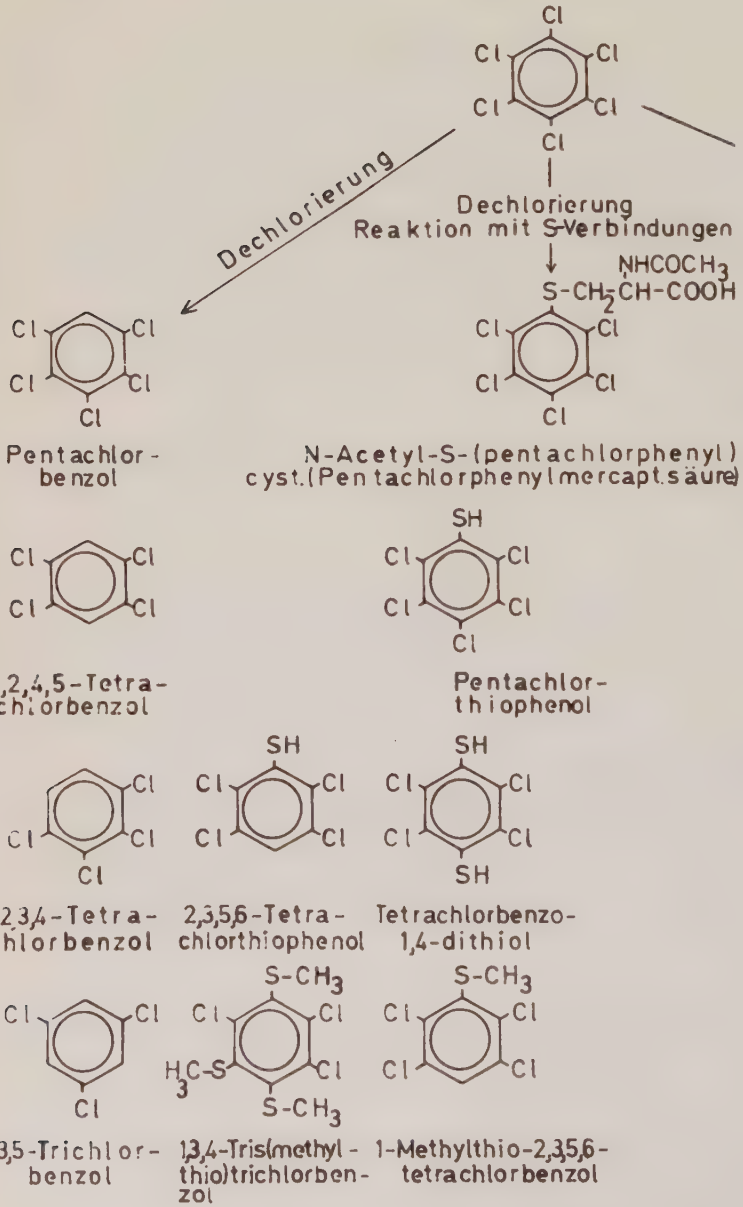
Die Konjugation zahlreicher Fremdstoffe und physiologischer Substrate mit GSH stellt eine der wesentlichsten Detoxikationsreaktionen der Leberzelle dar. Dabei werden Fremdstoffe mit entsprechender Konfiguration primär mit der freien SH-Gruppe des Tripeptids konjugiert. Nachfolgend werden die Glutaminsäure und der Glycinrest des Glutathions abgespalten und die α-Aminogruppe des über eine Thiolethergruppe gebundenen Cysteins durch Acetyl-CoA acetyliert. Besonders klar wurde dies von JOLLOW u. Mitarb. (16) am Beispiel des Brombenzols herausgearbeitet. Durch die mikrosomale Epoxid-Synthetase wird das Brombenzol epoxidiert. Das Epoxid kann nicht-enzymatisch an Makromoleküle der Zelle (DNS, RNS, Proteine) gebunden oder weitermetabolisiert werden. Für diese weitere Metabolisierung kommen ein enzymatischer und ein nicht-enzymatischer Schritt in Betracht. Nicht-enzymatisch wird das Brombenzol-Epoxid in para-Bromphenol umgesetzt. Enzymatisch kann über die GSH-Transferase ein Mercaptursäure-Derivat gebildet werden, das anschließend acetyliert wird. Eine weitere enzymatische Umsetzung kann durch die Epoxid-Hydrase erfolgen. In diesem Reaktionsschritt wird das Brombenzol-Epoxid zuerst in ein Diol und anschließend unter Herstellung der Aromatizität in Dihydroxy-Brombenzol umgewandelt (s. Abb. 3, S. 25).

Abb. 3:
Brombenzol-Metabolismus.

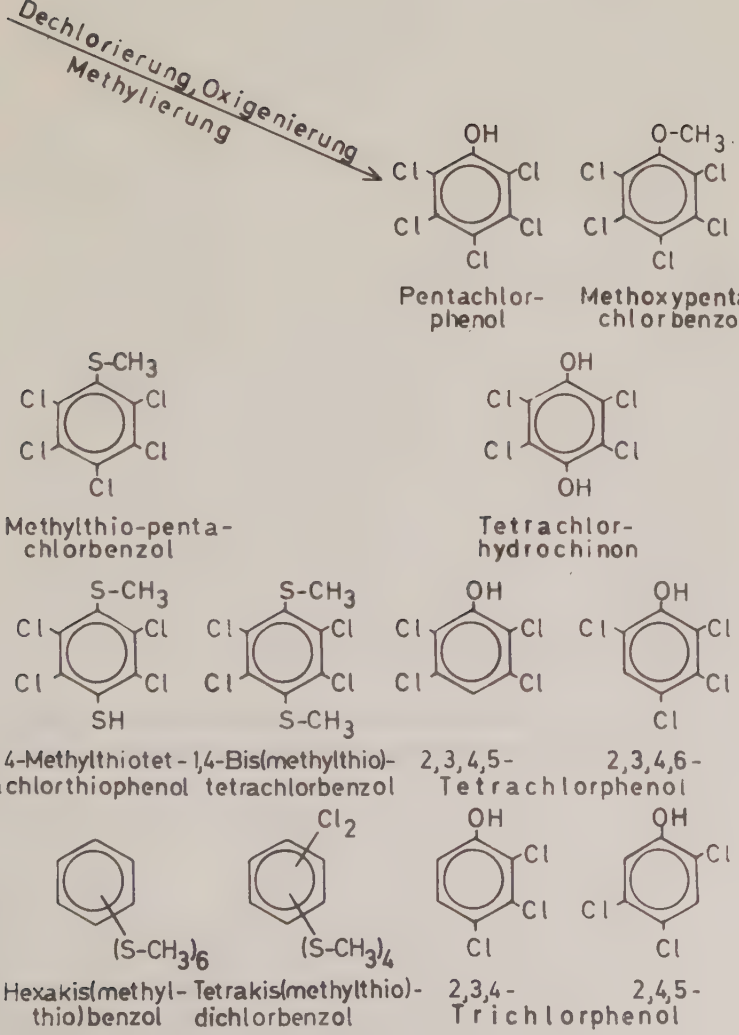


⊛ = Cytochrom P-450 oder MFO

Abb. 4: Biotransformation von



Hexachlorbenzol (HCB (9, 15, 17, 22, 26, 30, 31))



Die Einzelheiten der HCB-Metabolisierung sind bisher nicht so klar erarbeitet worden. Grundsätzlich können aber ähnliche Reaktionen wie bei der Metabolisierung des Brombenzols auftreten. Obwohl bis heute ca. 20 Metaboliten des HCB nachgewiesen wurden, sind Mechanismen der Dechlorierung des HCB nicht bekannt. Aufgrund der bisher vorliegenden Untersuchungsbefunde ergibt sich für die Verstoffwechslung des HCB folgendes Bild (s. Abb. 4, S. 26/27) (9, 15, 17, 22, 26, 30, 31).

Die große Bedeutung des GSH liegt in der Möglichkeit der Detoxikation elektrophiler Epoxide durch Konjugation, sofern diese nicht spontan umgelagert werden (s. Abb. 3, S. 25). Eine weitere Möglichkeit der Eliminierung der Epoxide ist die enzymatische Spaltung durch die Epoxid-Hydrase. Die Toxizität der Epoxide beruht auf der Möglichkeit zur covalenten Bindung an Makromoleküle der Zelle, wie DNS, RNS oder Proteine. Diese Wechselwirkungen mit der DNS führen zu erheblichen strukturellen und funktionellen Änderungen in der Funktion der Zelle. Die Anlagerung an die DNS beinhaltet die Gefahr der malignen Entartung der Zellen (chemische Cancerogenese (27)). Es ist deshalb gut vorstellbar, daß eine Verschiebung des GSH-Gehalts in der Leber zu erheblichen hepatischen Stoffwechselstörungen führt.

Der plötzliche Abfall des GSH in der Leber nach langzeitiger HCB-Gabe könnte durch einen Anstieg von HCB-Metaboliten hervorgerufen werden, die mit GSH enzyma-

tisch oder nicht-enzymatisch konjugiert worden sind.

Durch eine nachfolgende enzymatische Umsetzung (in Analogie zu Brombenzol, s. Abb. 3, S. 25) des GSH entstehen dann die Mercaptursäure-Derivate, die im Urin HCB-behandelter Ratten nachgewiesen werden konnten (31). Außerdem könnte die HCB-Ablagerung in der lipophilen Membran des endoplasmatischen Retikulums und/oder der Mitochondrien zu Permeabilitätsveränderungen führen, die ebenfalls zum Absinken des GSH-Gehalts in der Leber führen könnten.

Wie die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, konnte eine prophylaktische Anwendung des GSH in der hier verwendeten Dosis die durch chronische HCB-Exposition induzierte Porphyrie bei der Ratte nicht verhindern. Außerdem ließ sich in weiterführenden Experimenten zeigen, daß die bereits manifeste HCB-Porphyrie durch GSH nicht zu beeinflussen ist. Möglicherweise war aber durch die GSH-Applikation keine ausreichende Steigerung der Konzentration an SH-Gruppen in der Leber erzielt worden. Betrachtet man jedoch die Porphyrin-Ausscheidungen in wöchentlichen Abständen, so ist festzustellen, daß die zusätzliche GSH-Applikation zur HCB-Fütterung den Zeitpunkt der Porphyrie-Manifestation verzögert. Umgekehrt kommt es durch die Gabe von DEM zu einem vorzeitigen Auftreten der Porphyrie. Die Varianz-Analysen ergaben jedoch, daß diese zeitlichen Verschiebungen nicht signifikant waren. Ob nach einer Steigerung der GSH-

Dosierung eine Beeinflussung zu erzielen ist, wird weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben müssen. Wie die Befunde an den Tieren zeigen, bewirkt die GSH-Gabe sowohl bei den Kontroll- als auch bei den HCB-Tieren keine Verschiebungen des GSH-Gehalts der Leber. Inwieweit sich dies durch andere SH-Gruppen-Donatoren (z.B. Methionin, Cystein, N-Acetyl-Cystein) erzielen läßt, bleibt abzuwarten.

Andererseits kann der GSH-Gehalt durch die kontinuierliche Anwendung von DEM sginifikant gesenkt werden (s. Tab. 5, S. 23 (DEM-Kontrolle)). Bei Langzeit-Exposition mit HCB (63 Tage) läßt sich durch DEM jedoch keine Verstärkung des GSH-Verlustes der Leberzelle erreichen.

Diese Befunde unterstützen die Theorie von PALEKAR u. Mitarb. (28), wonach zwei unabhängige GSH-Speicher in der Leber angenommen werden. Trotz einer kontinuierlichen Anwendung von GSH-senkenden Substanzen läßt sich der GSH-Gehalt in der Leber nur bis zu einem Grenzwert vermindern, was sich am besten durch zwei verschiedene GSH-Pools erklären läßt.

Es konnte gezeigt werden, daß eine kontinuierliche Hemmung der Uroporphyrinogen-Decarboxylase im Verlauf der HCB-Exposition zu der charakteristischen Stoffwechselstörung (= HCB-Porphyrie) führt (35). Nach 80 Tagen HCB-Applikation (0.3 % HCB-Futter) beträgt die enzymatische Aktivität nur noch knapp 20 % des Wertes normaler Tiere (7). Die Uroporphyrinogen-Decarboxylase ist ein Enzym der Haem-Biosynthese,

dessen Aktivität von unveränderten SH-Gruppen im Molekül oder von Co-Faktoren abhängt. Durch Schwermetallionen (z.B. Fe, Co (MAINES und KAPPAS (23)) wird die Uroporphyrinogen-Decarboxylase gehemmt. Im Gegensatz dazu schützt GSH vor Inaktivierung der SH-Enzyme, indem es Schwermetallionen komplexartig bindet (24). Außer der Uroporphyrinogen-Decarboxylase sind andere Enzyme der Haem-Biosynthese ebenfalls als SH-abhängig bekannt (z.B. die δ-Aminolaevulinsäure-Dehydratase, die Ferrochelatase und die Haemoxygenase). Auch diese Enzyme werden durch Schwermetallionen gehemmt. Unter physiologischen Bedingungen wird diese Hemmung ebenfalls durch GSH verhindert (24).

HCB induziert - wahrscheinlich unabhängig von seiner porphyrogenen Wirkung - das Cytochrom P-450-System in der Rattenleber (11, 20, 33 34). Die Cytochrom P-450-abhängige, HCB-induzierte 7-Ethoxycumarin-Desethylierung wird weder durch die gleichzeitige GSH-, noch durch eine DEM-Applikation im Vergleich zu den entsprechenden HCB-Kontrollen verändert. Im Gegensatz dazu ergeben sich für den Cytochrom P-450-Gehalt der Leber in den einzelnen Versuchsgruppen Unterschiede; während die DEM-Zugabe zum HCB den Gehalt nicht steigert, senkt aber die zusätzliche GSH-Applikation den Cytochrom P-450-Gehalt signifikant. Dies könnte durch eine GSH-bedingte Bindung freier Metallionen erklärt werden, wodurch die Haemoxygenase geschützt und der Haem-Katabolismus im Vergleich zu den HCB- bzw. HCB/DEM-Tieren gesteigert wird.

Die Unterschiede in der Induktion - d.h. das differente Verhalten des Cytochrom P-450-Gehalts und der 7-Ethoxycumarin-Deethylierung unter den verschiedenen Versuchsbedingungen - lassen sich zum Teil aus der unterschiedlichen Empfindlichkeit der Methoden erklären. Außerdem wäre vorstellbar, daß das durch die zusätzliche GSH-Gabe gesenkte Cytochrom P-450 (Cytochrom P-450-Gehalt der HCB/GSH-Gruppe - s. Tab. 5, S. 23) relativ wenig 7-Ethoxycumarin-Deethylierungsaktivität aufweist, so daß der absolute Anteil der Enzymaktivität unverändert bleibt.

Weiterhin muß die Bedeutung des GSH als Antioxidans hervorgehoben werden. Da nur die reduzierten Formen der Porphyrine (die Porphyrinogene) biologisch verwertbar sind und letztlich zu Haem umgesetzt werden können, ergibt sich so eine weitere Beeinflussung der Haem-Biosynthese. Außer der HCB-bedingten Uroporphyrinogen-Decarboxylase-Hemmung könnte durch den GSH-Mangel eine vermehrte Oxidation von Uroporphyrinogen zu Uroporphyrin die Anhäufung von Porphyrin-Metaboliten in Leber und Urin erklären.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde untersucht, ob sich die HCB-bedingte Porphyrie weiblicher Ratten durch Glutathion (GSH) oder Diethylmaleat (DEM) (Substanz, die den GSH-Gehalt der Zelle senkt) verändern läßt. In der hier gewählten Versuchsanordnung wurden folgende Befunde erhoben:

Die DEM-Gabe führt zu einer Senkung des GSH-Spiegels in der Leber normaler Tiere, steigert jedoch nicht die HCB-bedingte GSH-Senkung in der Rattenleber. Durch GSH-Applikation läßt sich weder bei den HCB-Tieren noch bei den Kontrollen eine Steigerung des GSH-Gehalts der Leber erzielen. Weiterhin konnte durch die GSH-Gabe weder der Zeitpunkt der Porphyrie-Manifestation signifikant verändert werden, noch konnte eine bereits manifeste HCB-Porphyrie beeinflußt werden. Die Manifestation der HCB-Porphyrie (gemessen an der Porphyrin-Ausscheidung > 40 µg/Tier/Tag) trat bei gleichzeitiger DEM-Gabe frühzeitiger, bei gleichzeitiger GSH-Gabe später als bei den HCB-Kontrollen ein; allerdings waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant.

Der Porphyrin-Gehalt in der Leber und die Zusammensetzung der unterschiedlich carboxylierten Porphyrine im Urin der HCB-exponierten Tiere wurden weder durch GSH noch durch DEM beeinflußt. Der durch HCB

induzierte Cytochrom P-450-Gehalt in der Leber wird durch GSH gesenkt, während die DEM-Applikation keinen Einfluß auf diesen Parameter hatte. Trotz der Minderung des Cytochrom P-450-Gehalts durch GSH verändert sich die davon abhängige enzymatische Aktivität (7-Ethoxycumarin-Deethylierung) in den verschiedenen Versuchsgruppen nicht.

Es wird angenommen, daß die akut einsetzende GSH-Senkung durch HCB (ca. 40. - 50. Versuchstag) durch eine Hemmung der SH-abhängigen Enzyme der Haem-Biosynthese (vorherrschend Uroporphyrinogen-Decarboxylase) zur Porphyrie führt. Außerdem könnte der GSH-Verlust eine verstärkte Oxidation der Porphyrogene zu den biologisch unwirksamen Porphyrinen verursachen.

Der GSH-Verlust der Leber unter HCB dürfte in erster Linie durch den vermehrten Bedarf an GSH zur Verstoffwechslung des chlorierten Kohlenwasserstoffs bedingt sein.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. BOYLAND, E.; CHASSAUD, L.F.:
The Effect of Some Carbonyl Compounds on Rat Liver Glutathione Levels.
Biochem. Pharmacol. 19, 1526-1528 (1970)

2. CAM, C.; NIGOGOSYAN, G.:
Acquired Toxic Porphyria Cutanea Tarda Due to Hexachlorobenzene.
J. Amer. Med. Ass. 183, 88-91 (1963)

3. DOSS, M.:
Analytical and Preparative Thin-Layer Chromatography of Porphyrin Methyl Esters.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 8, 197-207 (1970)

4. DOSS, M.; SCHMIDT, A.:
Quantitative Bestimmung von δ-Aminolaevulinsäure und Porphobilinogen im Urin mit Ionenaustausch-Chromatographie-Fertigsäulen.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 9, 99-102 (1971)

5. DOSS, M.; SCHMIDT, A.:
Rapid Determination of Urinary Total Porphyrins by Ion Exchange Chromatography.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 9, 415-420 (1971)

6. DOSS, M.; SCHERMULY, E.; KOSS, G.:
Hexachlorobenzene Porphyria in Rats as a Model for Human Chronic Hepatic Porphyria.
Ann. Clin. Res. 8, Suppl. 17, 171-181 (1976)

7. ELDER, G.H.; EVANS, J.O.; MATLIN, S.A.:
The Effect of Porphyrogenic Compound, Hexachlorobenzene, on the Activity of Hepatic Uroporphyrinogen Decarboxylase in the Rat.
Clin. Sci. Mol. Med. 51, 71-80 (1976)

8. ELDER, G.:
Porphyria Caused by Hexachlorobenzene and Other Polyhalogenated Aromatic Hydrocarbons.
in: Heme and Hemoproteins, DE MATTEIS, F.; ALDRIDGE, W.N. (Eds.)
pp. 157-200
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1978

9. ENGST, R.; MACHOLZ, R.M.; KUJAWA, M.:
The Metabolism of Hexachlorobenzene (HCB) in Rats.
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 16/No. 2
Springer-Verlag, New York 1976

10. GILLETTE, J.R.:
Environmental Factors in Drug Metabolism.
Fed. Proc. 35, 1142-1147 (1976)

11. GOERZ, G.; KRIEG, Th.; BOLSEN, K.; LISSNER, R.:
Langzeit-Exposition von Ratten mit Hexachlorbenzol (HCB): Einfluß auf die Porphyrin-Ausscheidung im Urin und auf das Cytochrom P-450 in der Leber.
Arch. Derm. Res. 259, 199-206 (1977)

12. GOERZ, G.; VIZETHUM, W.; LISSNER, R.:
Verhalten des hepatischen Glutathion (GSH) bei der Ratte unter kontinuierlicher Hexachlorbenzol(HCB)-Gabe.
Dermatosen in Beruf u. Umwelt, im Druck

13. GOLDBERG, A.:
The Enzymatic Formation of Heme by the Incorporation of Iron into Protoporphyrin; Importance of Ascorbic Acid, Ergothioneine and Glutathione.
Brit. J. Haemat. 5, 150-157 (1959)

14. HAPKE, H.-J.; PRIGGE, E.:
Interaction of Lead and Glutathione with δ-Aminolevulinic Acid Dehydratase.
Arch. Toxicol. 31, 153-161 (1973)

15. JANSON, B.; BERGMANN, A.:
Sulfur-Containing Derivates of Hexachlorobenzene(HCB)-Metabolites in the Rat.
Chemosphere 8, 257-268 (1978)

16. JOLLOW, D.J.; MITCHELL, J.H.; ZAMPAGLIONE, N.; GILLETTE, J.R.:
Bromobenzene-Induced Liver Necrosis. Protective Role of Glutathione and Evidence for 3.4-Bromobenzene Oxide as the Hepatotoxic Metabolite.
Pharmacology 11, 151-169 (1974)

17. KOSS, G.; KORANSKY, W.; STEINBACH, K.:
Studies on the Toxicology of Hexachlorobenzene.
II. Identification and Determination of Metabolites.
Arch. Toxicol. (Berl.) 35, 107-114 (1976)

18. KOSS, G.; SEUBERT, S.; SEUBERT, A.; KORANSKY, W.; IPPEN, H.:
Studies in the Toxicology of Hexachlorobenzene.
III. Observations in a Long-Term Experiment.
Arch. Toxicol. (Berl.) 40, 285-294 (1978)

19. KUSHNER, J.P.; STEINMÜLLER, D.P.; LEE, G.R.:
The Role of Iron in the Pathogenesis of Porphyria Cutanea Tarda.
II. Inhibition of Uroporphyrinogen Decarboxylase.
J. Clin. Invest. 56, 661-667 (1977)

20. LISSNER, R.; EICHENAUER, M.; GOERZ, G.; IPPEN, H.:
Hexachlorobenzene Induced Porphyria in Rats. Relationship Between Porphyrin Excretion and Induction of Drug Metabolizing Enzymes.
Biochem. Pharmacol. 24, 1729-1731 (1975)

21. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.D.; RANDALL, R.S.:
Protein Measurement with Folin Phenol Reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

22. LUI, H.; SWEENEY, G.D.:
Hepatic Metabolism of Hexachlorobenzene in Rats.
FEBS Letters 51, 225-226 (1975)

23. MAINES, M.D.; KAPPAS, A.:
Metals as Regulators of Heme Metabolism.
Science 198, 1215-1221 (1977)

24. MAINES, M.D.; KAPPAS, A.:
Regulation of Heme Pathway and Cellular Glutathione Content by Metals that Do Not Chelate with Tetrapyrroles: Blockade of Metal Effects by Thiols.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 74, 1875-1878 (1977)

25. MATSUBARA, T.; KOIKE, M.; TOUCHI, A.; TOCHINO, Y.; SUGENO, K.:
Quantitative Determination of Cytochrome P-450 in Rat Liver Homogenates.
Ann. Biochem. 75, 596-603 (1976)

26. MEHENDALE, H.M.; FIELDS, M.; MATTHEWS, H.B.:
Metabolism and Effects of Hexachlorobenzene on Hepatic Microsomal Enzymes in the Rat.
J. Agr. Food Chem. 23, 261-265 (1975)

27. MILLER, J.A.:
Carcinogenesis by Chemicals: An Overview-G.H.A..
Clowes Memorial Lecture.
Cancer Res. 30, 559-576 (1970)

28. PALEKAR, A.P.; TATE, S.S.; MEISTER, A.:
Decrease in Glutathione Levels of Kidney and Liver after Injection of Methionine Sulfoximine into Rats.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 62, 651-657 (1975)

29. PATTERSON, J.W.; LAZAROW, A.:
Determination of Glutathione.
Methods Biochem. Anal. 11, 259-278 (1955)

30. RENNER, G.; SCHUSTER, K.P.:
2.4.5-Trichlorphenol. A New Urinary Metabolite of Hexachlorobenzene.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 39, 355-356 (1977)

31. RENNER, G.; RICHTER, E.; SCHUSTER, K.P.:
N-Acetyl-S(Pentachlorophenyl)-Cystein, a New Urinary Metabolite of Hexachlorobenzene.
Chemosphere 8, 663-668 (1978)

32. SCHMID, R.:
Cutaneous Porphyria in Turkey.
New Engl. J. Med. 263, 397-398 (1960)

33. STONARD, M.D.:
Effect of Hexachlorobenzene on Hepatic Microsomal Enzymes in the Rat.
Biochem. Pharmacol. 23, 2175-2183 (1974)

34. STONARD, M.D.:
Experimental Hepatic Porphyria Induced by Hexachlorobenzene as a Model of Human Symptomatic Porphyria.
Brit. J. Haemat. 27, 617-625 (1974)

35. TALJAARD, J.J.F.; SHANLEY, B.C.; JOUBERT, S.M.:
Decreased Uroporphyrinogen Decarboxylase Activity in Experimental Symptomatic Porphyria.
Live Sciences 10, 887-893 (1971)

36. TSCHUDY, D.P.; BONKOWSKY, H.:
Experimental Porphyria.
Fed. Proc. 31, 147-159 (1972)

37. ULLRICH, V.; WEBER, P.:
The O-Dealkylation of 7-Ethoxycoumarin by Liver Microsomes.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1171-1177 (1972)

38. WINER, B.J.:
in: Statistical Principles in Experimental Design.
MacGraw-Hill Co., New York 1962

7. DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. Dr. A. GREITHER danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seiner Klinik durchzuführen.

Herrn Professor Dr. G. GOERZ danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, für die vielen Anregungen sowie für die Hilfestellung bei der Abfassung der Dissertationsschrift.

Herrn Dipl.-Chemiker Dr. W. VIZETHUM danke ich sehr für die methodischen und fachlichen Ratschläge sowie seine Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit.

8. LEBENSLAUF

Am 1.11.1945 wurde ich in Billerbeck (Reg.Bez. Münster/Westf.) geboren.

Aufgewachsen bin ich in Coesfeld/Westf., wo ich auch die Grundschule und das Gymnasium besuchte. Das Gymnasium verließ ich 1963 aus der Obertertia.

Nach einer dreijährigen Ausbildung zum Elektroinstallateur bei der Fa. A. Tombeil in Osterwick (Kr. Coesfeld) wurde ich von 1966 bis 1968 zum Grundwehrdienst einberufen.

Von 1969 bis 1974 war ich als Krankenpfleger im Dominikus-Krankenhaus (Düsseldorf-Heerdt) beschäftigt. Gleichzeitig besuchte ich das Abendgymnasium der Stadt Düsseldorf.

Nach der Reifeprüfung im Jahre 1973 wurde mir im Wintersemester 1973/74 an der Universität Düsseldorf ein Studienplatz in Humanmedizin zugeteilt.

Zur Zeit absolviere ich den letzten Studienabschnitt, das praktische Jahr, an den Städtischen Krankenanstalten in Krefeld.